

PCT/JP03/09140

18.07.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 05 SEP 2003

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて PCT
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 7月18日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-210067
[ST. 10/C]: [JP2002-210067]

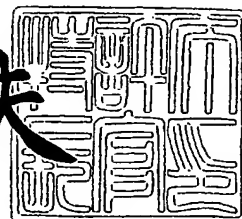
出 願 人
Applicant(s): 遠藤 弥重太

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 8月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 J09065

【提出日】 平成14年 7月18日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明の名称】 標識化単鎖抗体およびその利用

【請求項の数】 18

【国際特許分類】 C12P 21/00
C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 愛媛県松山市歩行町 1-13-9 アークレジデンス歩
行町 303

【氏名】 川崎 平康

【発明者】

【住所又は居所】 愛媛県松山市本町 3-1-8-701

【氏名】 澤崎 達也

【発明者】

【住所又は居所】 愛媛県松山市久万ノ台 478番地 17

【氏名】 遠藤 弥重太

【特許出願人】

【識別番号】 594016182

【氏名又は名称】 遠藤 弥重太

【特許出願人】

【識別番号】 000005968

【氏名又は名称】 三菱化学株式会社

【代理人】

【識別番号】 100103997

【弁理士】

【氏名又は名称】 長谷川 曉司

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 035035

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 標識化単鎖抗体およびその利用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 抗体の重鎖および軽鎖がリンカーを介して架橋する構造を有し、かつリンカー部分に標識化物質を有することを特徴とする標識化単鎖抗体。

【請求項 2】 抗体の重鎖および軽鎖が、可変領域であることを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】 標識化物質が、特定の酵素の存在下で抗体のリンカー部分のポリペプチドに結合し得る物質であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の抗体。

【請求項 4】 標識化物質が、抗体のリンカー部分の一部として組み込まれている物質であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の抗体。

【請求項 5】 標識化物質がビオチンであり、酵素がビオチンリガーゼであることを特徴とする請求項 3 に記載の抗体。

【請求項 6】 特定抗原への結合性を有する抗体の重鎖および軽鎖をコードする DNA が、リンカーをコードする DNA を介して連結されていることを特徴とする DNA。

【請求項 7】 抗体の重鎖および軽鎖が可変領域である請求項 6 に記載の DNA。

【請求項 8】 リンカーをコードする DNA が、翻訳後に特定の酵素の存在下で標識化物質を結合し得る塩基配列を含むことを特徴とする請求項 6 または 7 に記載の DNA。

【請求項 9】 リンカーをコードする DNA が、標識化物質をコードする塩基配列を含むことを特徴とする請求項 6 または 7 に記載の DNA。

【請求項 10】 標識化物質を結合し得る塩基配列が、b i r Aであることを特徴とする請求項 8 に記載の DNA。

【請求項 11】 請求項 6～8 または 10 のいずれかに記載の DNA を、標識化物質および特定の酵素の存在下でタンパク質合成系を用いて転写翻訳することを特徴とする標識化単鎖抗体の作製方法。

【請求項 12】 請求項 6、7 または 9 のいずれかに記載の DNA をタンパク質合成系を用いて転写翻訳することを特徴とする標識化単鎖抗体の作製方法。

【請求項 13】 タンパク質合成系が、無細胞タンパク質翻訳系であって、その翻訳反応液中の還元剤の濃度が、作製する単鎖抗体のジスルフィド結合が保持され、かつ無細胞タンパク質合成が可能な濃度であることを特徴とする請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 14】 さらにジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素の存在下で行うことを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】 請求項 1～5 のいずれかに記載の抗体の標識化物質と特異的に結合する物質を表面に有する基盤上に、請求項 1～5 のいずれかに記載の抗体を接触させることを特徴とする固相化単鎖抗体の作製方法。

【請求項 16】 標識化物質がビオチンであり、該物質と特異的に結合する物質がストレプトアビジンであることを特徴とする請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】 請求項 15 または 16 に記載の方法により作製される固相化単鎖抗体。

【請求項 18】 請求項 17 に記載の固相化単鎖抗体に披検物質を接触させ、該抗体との結合性を解析することを特徴とする抗原抗体反応の解析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は抗体の重鎖および軽鎖がリンカーを介して架橋する構造を有し、かつリンカー部分に標識化物質を有することを特徴とする標識化単鎖抗体、およびその利用方法等に関する。

【0002】

【従来の技術】

単鎖抗体は、完全 IgG に比較して抗原結合領域のみからなる小さなサイズであるため、細胞に対する非特異的結合が軽減できる点が特徴である。単鎖抗体を抗原抗体反応の解析に用いる場合、免疫反応を追跡する目的で抗体に種々の標識をする方法が開発されている (Cloutier, S. M. et al., Mol

. Immunol., 37, 1067-1077 (2000))。抗体を標識する方法としては、抗体のC末またはN末にビオチン等をビオチンリガーゼにより結合する方法 (Cloutier, S. M., et al., Mol. Immunol., 37, 1067-1077 (2000)) などが提案されているが、該標識により、抗体の抗原との結合活性を低下させる点などが問題であった。

【0003】

また近年、細胞表面に存在する特異抗原を迅速にかつ多量に検出することなどを目的として、このような抗体をチップやビーズなどに固相化する技術の開発も目覚ましい (Mitchell, P., Nature Biotechnology, 20, 225-229 (2002))。具体的には、マイクロスポッティング法、マイクロプリンティング法、化学修飾法等が用いられているが、これらはいずれも抗体の抗原への結合活性の低下、高密度化の困難性などの点で問題があった。

【0004】

一方、タンパク質の固相化に基盤に共有結合するストレプトアビジン／ビオチンなどの特異的結合性を有する物質をリンカーとして結合させる方法も提案されている。しかし、該方法においても抗体をその抗原との結合性を保持させて固相化した例はない。

【0005】

【本発明が解決しようとする課題】

本発明は、抗体の抗原との結合活性を保持したまま該抗体を標識化する方法を提供することを目的とする。また、抗体の抗原との結合性を保持したまま該抗体を固相化する方法、および該方法に用いるための標識化単鎖抗体を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、抗体の重鎖と軽鎖がリンカーを介して結合している単鎖抗体のリンカー部分にビオチンを結合させ、ストレプトアビジンを表面にコートした基盤に該単鎖抗体を接触させ、

該抗体を基盤に結合した。このようにして作製した固相化単鎖抗体に抗原を接触させたところ、該抗体の抗原との結合性が非常に高く保持されていることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて成し遂げられたものである。

【0007】

即ち、本発明によれば、

- (1) 抗体の重鎖および軽鎖がリンカーを介して架橋する構造を有し、かつリンカー部分に標識化物質を有することを特徴とする標識化単鎖抗体、
- (2) 抗体の重鎖および軽鎖が、可変領域であることを特徴とする上記(1)に記載の抗体、
- (3) 標識化物質が、特定の酵素の存在下で抗体のリンカー部分のポリペプチドに結合し得る物質であることを特徴とする上記(1)または(2)に記載の抗体、
- (4) 標識化物質が、抗体のリンカー部分の一部として組み込まれている物質であることを特徴とする上記(1)または(2)に記載の抗体、
- (5) 標識化物質がビオチンであり、酵素がビオチンリガーゼであることを特徴とする上記(3)に記載の抗体、
- (6) 特定抗原への結合性を有する抗体の重鎖および軽鎖をコードするDNAが、リンカーをコードするDNAを介して連結されていることを特徴とするDNA、
- (7) 抗体の重鎖および軽鎖が可変領域である上記(6)に記載のDNA、
- (8) リンカーをコードするDNAが、翻訳後に特定の酵素の存在下で標識化物質を結合し得る塩基配列を含むことを特徴とする上記(6)または(7)に記載のDNA、
- (9) リンカーをコードするDNAが、標識化物質をコードする塩基配列を含むことを特徴とする上記(6)または(7)に記載のDNA、
- (10) 標識化物質を結合し得る塩基配列が、b i r Aであることを特徴とする上記(8)に記載のDNA、
- (11) 上記(6)～(8)または(10)のいずれかに記載のDNAを、標識化物質および特定の酵素の存在下でタンパク質合成系を用いて転写翻訳すること

を特徴とする標識化単鎖抗体の作製方法、

(12) 上記(6)、(7)または(9)のいずれかに記載のDNAをタンパク質合成系を用いて転写翻訳することを特徴とする標識化単鎖抗体の作製方法、

(13) タンパク質合成系が、無細胞タンパク質翻訳系であって、その翻訳反応液中の還元剤の濃度が、作製する単鎖抗体のジスルフィド結合が保持され、かつ無細胞タンパク質合成が可能な濃度であることを特徴とする上記(11)または(12)に記載の方法、

(14) さらにジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素の存在下で行うことを特徴とする上記(13)に記載の方法、

(15) 上記(1)～(5)のいずれかに記載の抗体の標識化物質と特異的に結合する物質を表面に有する基盤上に、上記(1)～(5)のいずれかに記載の抗体を接触させることを特徴とする固相化単鎖抗体の作製方法、

(16) 標識化物質がビオチンであり、該物質と特異的に結合する物質がストレプトアビジンであることを特徴とする上記(15)に記載の方法、

(17) 上記(15)または(16)に記載の方法により作製される固相化単鎖抗体、

(18) 上記(17)に記載の固相化単鎖抗体に披検物質を接触させ、該抗体との結合性を解析することを特徴とする抗原抗体反応の解析方法、
を提供する。

【0008】

【発明の実施の形態】

(1) 標識化単鎖抗体

本発明に用いられる単鎖抗体は、抗体の重鎖および軽鎖がリンカーを介して結合しており、かつ該抗体が特異的な結合親和性を有する抗原と結合する活性を有するものであれば如何なるものであってもよい。好ましくは、抗体の重鎖が単鎖抗体分子のN末端に位置するものが用いられる。抗体は、特定の抗原を認識して結合する活性を有するモノクローナル抗体が好ましい。また、抗体の重鎖および軽鎖は、その全長を含む必要はなく、抗原を認識して特異的な親和結合性を有するに十分な部位であればよい。具体的には可変領域が好ましく用いられる。

【0009】

リンカーは、抗体の重鎖および軽鎖が該リンカーを介して架橋するに十分な長さであり、かつ標識化物質を有するための構造を有するものであれば特に制限はない。一般的には10～30アミノ酸からなるポリペプチドが好ましく用いられる。具体的な構造については、後述する標識化物質に応じて適宜選択することができる。

【0010】

標識化物質としては、本発明の単鎖抗体を標識する目的で用いられるもの（以下、これを「シグナル物質」と称することがある）と、本発明の単鎖抗体を固相化する目的で用いられるもの（以下、これを「固相化物質」と称することがある）が好ましい。具体的には、シグナル物質としては、アミノ酸に結合し得る蛍光色素、例えばフルオレセイン系列、ローダミン系列、エオシン系列、NBD系列などや、光増感剤、例えば、メチレンブルーやローズベンガルなどや、あるいは、核磁気共鳴スペクトル（NMR）において特異的シグナルを与える物質、例えばフッ素やリン原子を含むアミノ酸などが挙げられる。また、固相化物質としては、固相表面上に結合させた特定の物質（以下、これを「アダプター物質」と称することがある）と結合する物質であれば如何なるものであってもよい。固相化物質とアダプター物質の組み合わせとしては、例えば、ビオチン／アビジンおよびストレプトアビジンなどのビオチン結合タンパク質、マルトース／マルトース結合タンパク質、グアニンヌクレオチド／Gタンパク質、ポリヒスチジンペプチド／ニッケルあるいはコバルト等の金属イオン、グルタチオン－S－トランスフェラーゼ／グルタチオン、DNA結合タンパク質／DNA、抗体／抗原分子（エピトープ）、カルモジュリン／カルモジュリン結合ペプチド、ATP結合タンパク質／ATP、あるいはエストラジオール受容体タンパク質／エストラジオール等の各種受容体タンパク質／そのリガンド等が挙げられる。これらは、いずれが固相化物質でもアダプター物質でもよい。これらの中で、固相化物質がビオチンでアダプター物質がストレプトアビジン、または固相化物質がポリヒスチジンペプチドでアダプター物質がニッケル等が好ましく用いられる。

【0011】

標識化物質は、そのリンカー部分への結合方法において特定の酵素の存在下で抗体のリンカー部分のポリペプチドに結合し得る物質を用いることもできる。このような物質としては、例えば、ビオチン等が挙げられる。標識物質としてビオチンを用いる場合、特定の酵素としてビオチンリガーゼが挙げられ、リンカーはビオチンリガーゼにより認識されるアミノ酸配列を有するもの等が挙げられる。

【0012】

また、標識化物質は、抗体のリンカー部分の一部として組み込まれている物質であってもよく、その具体例としては、ポリヒスチジンペプチドが挙げられる。この場合には、リンカーにはポリヒスチジンペプチドを含むものが用いられる。

標識化物質のリンカー部分への結合、または組み込みは、用いるシグナル物質あるいは固相化物質とアダプター物質との性質に応じて、それ自体既知の方法により行うことができる。

【0013】

(2) 標識化単鎖抗体の作製方法

本発明の標識化単鎖抗体は、例えば以下の方法により作製される。まず (i) 目的のタンパク質またはその一部を抗原として認識するモノクローナル抗体を作製し、(ii) 該モノクローナル抗体をコードする DNA を取得する。さらにその重鎖および軽鎖をコードする配列を特定し、リンカーをコードする塩基配列を挟んで連結する（以下、この DNA 断片を「単鎖抗体ユニット」と称することがある）。(iii) 作製した単鎖抗体ユニットがコードするタンパク質をその構造が正しく保持される適当な方法で合成する。合成の際、あるいは合成後、標識化物質をリンカー部分に結合する場合には、これを結合させる。これらの詳細な方法について以下に説明する。

【0014】

(i) モノクローナル抗体の作製

本発明の単鎖抗体の抗原は特に制限はなく、免疫原性を有するものであれば如何なるものであってもよい。具体的には、例えば、サルモネラ糖鎖等が挙げられる。これらの抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体の調製方法としては、通常用いられる公知の方法を用いることができ、抗原として用いられるポリペ

チドについても、公知の方法に従って抗原性が高くエピトープ（抗原決定基）として適した配列を選択して用いることができる。エピトープの選択方法としては、例えばE p i t o p e A d v i s e r（富士通九州システムエンジニアリング社製）等の市販のソフトウェアを用いることができる。

【0015】

上記の抗原として用いるポリペプチドは、公知の方法に従って合成した合成ペプチドを用いることが好ましい。抗原となるポリペプチドは、公知の方法に従って適当な溶液等に調製して、哺乳動物、例えばウサギやマウス等に免疫を行えばよいが、安定的な免疫を行ったり抗体価を高めるために抗原ペプチドを適当なキャリアタンパク質とのコンジュゲートにして用いたり、アジュバント等を加えて免疫を行うのが好ましい。

【0016】

免疫に際しての抗原の投与経路は特に限定されず、例えば皮下、腹腔内、静脈内、あるいは筋肉内等のいずれの経路を用いてもよい。具体的には、例えばBALB/cマウスに抗原ポリペプチドを数日～数週間おきに数回接種する方法等が用いられる。また、抗原の摂取量としては、抗原がポリペプチドの場合0.3～0.5mg/1回が好ましいが、ポリペプチドの種類、また免疫する動物種によっては適宜調節される。

【0017】

免疫後、適宜試験的に採血を行って固相酵素免疫検定法（以下、これを「ELISA法」と称することがある）やウエスタンブロッティング等の方法で抗体価の上昇を確認し、十分に抗体価の上昇した動物から採血を行う。これに抗体の調製に用いられる適当な処理を行えばポリクローナル抗体を得ることができる。具体的には、例えば、公知の方法に従い血清から抗体成分を精製した精製抗体を取得する方法等が挙げられる。また、該動物の脾臓細胞とミエローマ細胞とを用いて公知の方法に従って融合させたハイブリドーマを用いる（Milstein, et al., Nature, 256, 495 (1975)）ことによりモノクローナル抗体を作製することもできる。モノクローナル抗体は、例えば以下の方法により取得することができる。

【0018】

まず、上記した抗原の免疫により抗体価の高まった動物から抗体産生細胞を取得する。抗体産生細胞は、形質細胞、及びその前駆細胞であるリンパ球であり、これは個体の何れから取得してもよいが、好ましくは脾臓、リンパ節、末梢血等から取得する。これらの細胞と融合させるミエローマとしては、一般的にはマウスから得られた株化細胞、例えば8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来等)ミエローマ細胞株であるP3X63-Ag8.653(ATCC:CRL-1580)、P3-NS1/1Ag4.1(理研セルバンク:RCB0095)等が好ましく用いられる。細胞の融合は、抗体産生細胞とミエローマ細胞を適当な割合で混合し、適当な細胞融合培地、例えばRPMI1640やイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)、あるいはダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)等に、50%ポリエチレングリコール(PEG)を溶解したもの等を用いることにより行うことができる。また電気融合法(U. Zimmermann, et al., Naturwissenschaften, 68, 577 (1981))によっても行うことができる。

【0019】

ハイブリドーマは、用いたミエローマ細胞株が8-アザグアニン耐性株であることを利用して適量のヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン(HAT)液を含む正常培地(HAT培地)中で5%CO₂、37℃で適当時間培養することにより選択することができる。この選択方法は用いるミエローマ細胞株によって適宜選択して用いることができる。選択されたハイブリドーマが産生する抗体の抗体価を上記した方法により解析し、抗体価の高い抗体を産生するハイブリドーマを限界希釈法等により分離し、分離した融合細胞を適当な培地で培養して得られる培養上清から硫酸分画、アフィニティークロマトグラフィー等の適当な方法により精製してモノクローナル抗体を得ることができる。また精製には市販のモノクローナル抗体精製キットを用いることもできる。さらには、免疫した動物と同系統の動物、またはヌードマウス等の腹腔内で上記で得られた抗体産生ハイブリドーマを増殖させることにより、本発明のモノクローナル抗体を大量に含む腹水を得ることもできる。

【0020】

(i i) モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードするDNAの取得および単鎖抗体ユニットの作製

上記(i)で取得したモノクローナル抗体の重鎖(H鎖)および軽鎖(L鎖)をコードするDNAを取得する方法として、具体的には、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより得られる免疫グロブリンのH鎖、及びL鎖の一部、好ましくは可変領域(V領域)が有するアミノ酸配列の一部のアミノ酸配列を解析し、そのアミノ酸配列を基にこれをコードする遺伝子をクローニングする方法等が挙げられる。ここで、モノクローナル抗体のH鎖およびL鎖の可変領域とは、フレームワーク領域(FR)と超可変領域(CDR)よりなるものが好ましい。

【0021】

かくして得られるH鎖およびL鎖の可変領域をコードするDNAとしては、例えば、サルモネラ菌のO-抗原を認識する単鎖抗体のものとして、Anand, N. N., et al., J. Biol. Chem., 266, 21874-21879 (1991)に記載の配列からなるDNA等が挙げられる。

かくして得られるH鎖およびL鎖の可変領域をコードするDNAの間にリンカーをコードするDNAを挟んで両DNA断片を適当な方法で結合し、単鎖抗体ユニットを作製する。ここで、単鎖抗体ユニットは、単独でDNA断片として取得する必要はなく、後述する発現用ベクター等への挿入と同時に構築してもよい。リンカーをコードするDNAとしては、(1)に記載したリンカーをコードするDNAであれば何れのものでもよい。具体的に、例えば、ビオチンリガーゼ(birA)に認識されるアミノ酸配列(Peter J. Schatz (1993) Biotechnology, 11 (1138-1143)を含むリンカーをコードするDNAが好ましく、配列番号1に示すもの等が挙げられる。また、標識化物質がリンカー部分の一部として組み込まれている例としては、ポリヒスチジンペプチドをコードする塩基配列を含むもの等が挙げられる。

【0022】

リンカーをコードするDNAは通常用いられる方法を用いて作製することがで

きるが、化学合成によって作製することが好ましい。

【0023】

(iii) 単鎖抗体の作製

かくして得られる単鎖抗体ユニットは、これを適当なプロモーターの制御下になるように連結し、宿主に導入するか、あるいは適当な方法で転写した後に無細胞タンパク質翻訳系を用いて、作製する単鎖抗体のジスルフィド結合が保持される条件で発現させることにより単鎖抗体を作製することができる。ここで、抗原との結合性の低い抗体は、それ自体既知の進化工学的手法を用いることによりさらに結合性の高い抗体として取得することもできる。

【0024】

適当なプロモーターとは、用いる宿主、または転写に用いるRNA合成酵素により適宜選択することができる。具体的には、転写にSP6 RNA合成酵素を用いる場合には、SP6プロモーターを用いることが好ましい。また、無細胞タンパク質翻訳系を用いる場合には、プロモーターと単鎖抗体ユニットとの間に、翻訳活性を増強する塩基配列を挿入することが好ましい。翻訳活性を増強させる塩基配列として具体的には、真核生物においては、5' キャップ構造 (Shatkin, Cell, 9, 645- (1976))、コザック配列 (Kizak, Nucleic Acid. Res., 12, 857- (1984)) 等があり、また原核生物においてはシャインダルガーノ配列等が知られている。更にはRNAウィルスの5' -非翻訳リーダー配列にも翻訳促進活性があることが見出されており (特許第2814433号公報)、これらの配列を用いてタンパク質合成を効率よく行う方法が開発されている (特開平10-146197号公報)。また、ランダム配列についてそのポリソーム形成への影響を指標として翻訳エンハンス配列を選択する方法によって得られた配列も挙げられる (特願2001-396941明細書)。かくして作製されるDNAを以下、翻訳鋳型と称することがある。

【0025】

翻訳鋳型の具体例としては、サルモネラ菌のO-抗原を認識するものとして、例えば図1に示す構造を有するものが挙げられる。

翻訳鋳型を導入する宿主としては、通常タンパク質の合成に用いられるものであって、単鎖抗体が有するジスルフィド結合が保持され得るものを用いる。このような宿主として具体的には、E. coli DHBA strain (Paola Jurado et al, J. Mol. Biol., 320, 1-10 (2002)) 等が挙げられる。また、翻訳鋳型を転写した後に無細胞タンパク質翻訳系により単鎖抗体を作製する場合、用いられる無細胞タンパク質翻訳系の無細胞タンパク質合成用細胞抽出液としては、無細胞タンパク質翻訳系においてタンパク質合成能を有するものであれば如何なるものであってもよい。本発明に用いられる細胞抽出液として具体的には、大腸菌等の微生物、植物種子の胚芽、ウサギ網状赤血球等の細胞抽出液等、既知のものが用いられる。これらは市販のものを用いることもできるし、それ自体既知の方法、具体的には大腸菌抽出液は、Pratt, J. M. et al., Transcription and Translation, Hames, 179-209, B. D. & Higgins, S. J., eds), IRL Press, Oxford (1984) に記載の方法等に準じて調製することもできる。

【0026】

市販の細胞抽出液としては、大腸菌由来のものは、E. coli S30 extract system (Promega社製) と RTS500 Rapid Translation System (Roche社製) 等が挙げられ、ウサギ網状赤血球由来のものは Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega社製) 等、さらにコムギ胚芽由来のものは PROTEIOS™ (TOYOBO社製) 等が挙げられる。

【0027】

このうち、分子内ジスルフィド結合を保持され、かつタンパク質が合成される反応液は、上記の無細胞翻訳系を行う反応液（以下、これを「弱還元型翻訳反応液」と称することがある）のタンパク質合成に必要な成分のうち、還元剤の濃度を調製することにより作製することができる。具体的な還元剤とその濃度としては、ジチオスレイトール（以下これを「DTT」と称することがある）を最終濃度 20～70 μ M、好ましくは 30～50 μ M、2-メルカプトエタノールを最

終濃度 0.1 ~ 0.2 mM、グルタチオン／酸化型グルタチオンの濃度が 30 ~ 50 μ M / 1 ~ 5 μ M の範囲等が挙げられる。

【0028】

このような翻訳反応液中の還元剤濃度は、上記したものに限定されるものではなく、合成しようとするタンパク質、あるいは用いる無細胞タンパク質翻訳系の種類により適宜変更することができる。還元剤の至適濃度範囲の選択法としては、特に制限はないが、例えば、ジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素の効果によって判断する方法を挙げることができる。具体的には、還元剤の濃度を様々なにふった翻訳反応液を調製し、これらにジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素を添加して分子内にジスルフィド結合を有するタンパク質合成を行う。また、対照実験として同様の翻訳反応液にジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素を添加しないで同様のタンパク質合成を行う。ここで合成されるタンパク質の可溶化成分を、例えば遠心分離等の方法により分離する。この可溶化成分が全体の 50 % (可溶化率 50 %) 以上であり、またその可溶化成分がジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素の添加により増加した反応液が、該タンパク質の分子内ジスルフィド結合を保持したまま合成する反応液として適していると判断することができる。さらには、上記のジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素の効果によって選択された還元剤の濃度範囲のうち、合成されるタンパク質量の最も多い還元剤の濃度をさらに好ましい濃度範囲として選択することができる。

【0029】

このような還元剤濃度を有する反応液の調製方法としては、還元剤を含まない無細胞タンパク質合成用細胞抽出液を調製し、これに無細胞タンパク質翻訳系に必要な成分とともに、上記の濃度範囲となるように還元剤を添加する方法や、無細胞タンパク質合成用細胞抽出液から上記の濃度範囲となるように還元剤を除去する方法等が用いられる。無細胞タンパク質合成用細胞抽出液はこれを抽出する際に高度の還元条件を必要とするため、抽出後にこの溶液から還元剤を取り除く方法がより簡便である。細胞抽出液から還元剤を取り除く方法としては、ゲルろ過用担体を用いる方法等が挙げられる。具体的には、例えば、セファデックス G-25 カラムを予め還元剤を含まない適当な緩衝液で平衡化してから、これに細

胞抽出液を通す方法等が挙げられる。

【0030】

さらにこの細胞抽出液を凍結乾燥することにより凍結乾燥製剤とした後に、これに適当な緩衝液を添加して用いることもできる。凍結乾燥する場合、潮解性の物質の総濃度が60 mM以下にして行うことが好ましい。また、該細胞抽出液に上記の翻訳鋳型を添加してから凍結乾燥することもできる。

また、弱還元型翻訳反応液にさらにジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素を添加して翻訳反応を行えば、分子内のジスルフィド結合が保持されたタンパク質を高効率で合成することができる。ジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素としては、例えばタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ等が挙げられる。これらの酵素の無細胞翻訳系への添加量は、酵素の種類によって適宜選択することができる。具体的には、コムギ胚芽から抽出した無細胞タンパク質合成用細胞抽出液であって、還元剤としてDTTを20～70、好ましくは30～50 μ M含有する翻訳反応液にタンパク質ジスルフィドイソメラーゼを添加する場合、最終濃度で0.01～10 μ Mの範囲、好ましくは0.5 μ Mとなるように添加する。また、添加の時期はジスルフィド結合が形成される効率から無細胞翻訳反応開始前に添加しておくことが好ましい。

【0031】

このような無細胞タンパク質翻訳系うち、特に植物種子の胚芽抽出液を用いることが好ましく、この細胞抽出液を用いる場合を例として、単鎖抗体の作製方法を詳細に説明する。

植物種子としては、コムギ、オオムギ、イネ、コーン等のイネ科の植物のものが好ましい。本発明の細胞抽出液としては、このうちコムギ胚芽抽出液を用いたものが好適である。

【0032】

コムギ胚芽の選別法としては、例えばJohnston, F. B. et al., Nature, 179, 160-161 (1957)を用いることができ、また胚芽からの細胞抽出液の作製方法としては、Erickson, A. H. et al., Meth. In Enzymol., 96, 38-50 (199

6) 等に記載の方法を用いることができる。さらに好ましい調製方法としては下述のとおりである。

【0033】

通常、胚芽の部分は非常に小さいので胚芽を効率的に取得するためには胚芽以外の部分をできるだけ除去しておくことが好ましい。通常、まず、植物種子に機械的な力を加えることにより、胚芽、胚乳破砕物、種皮破砕物を含む混合物を得、該混合物から、胚乳破砕物、種皮破砕物等を取り除いて粗胚芽画分（胚芽を主成分とし、胚乳破砕物、種皮破砕物を含む混合物）を得る。植物種子に加える力は、植物種子から胚芽を分離することができる程度の強さであればよい。具体的には、公知の粉碎装置を用いて、植物種子を粉碎することにより、胚芽、胚乳破砕物、種皮破砕物を含む混合物を得る。

【0034】

植物種子の粉碎は、通常公知の粉碎装置を用いて行うことができるが、ピンミル、ハンマーミル等の被粉碎物に対して衝撃力を加えるタイプの粉碎装置を用いることが好ましい。粉碎の程度は、使用する植物種子胚芽の大きさに応じて適宜選択すればよいが、例えばコムギ種子の場合は、通常、最大長さ4 mm以下、好ましくは最大長さ2 mm以下の大きさに粉碎する。また、粉碎は乾式で行うのが好ましい。

【0035】

次いで、得られた植物種子粉碎物から、通常公知の分級装置、例えば、篩を用いて粗胚芽画分を取得する。例えば、コムギ種子の場合、通常、メッシュサイズ0.5 mm～2.0 mm、好ましくは0.7 mm～1.4 mmの粗胚芽画分を取得する。さらに、必要に応じて、得られた粗胚芽画分に含まれる種皮、胚乳、ゴミ等を風力、静電気力を利用して除去してもよい。

【0036】

また、胚芽と種皮、胚乳の比重の違いを利用する方法、例えば重液選別により、粗胚芽画分を得ることもできる。より多くの胚芽を含有する粗胚芽画分を得るために、上記の方法を複数組み合わせてもよい。さらに、得られた粗胚芽画分から、例えば目視や色彩選別機等を用いて胚芽を選別する。

このようにして得られた胚芽画分は、胚乳成分が付着している場合があるため、通常胚芽純化のために更に洗浄処理することが好ましい。洗浄処理としては、通常10℃以下、好ましくは4℃以下に冷却した水又は水溶液に胚芽画分を分散・懸濁させ、洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄することが好ましい。また、通常10℃以下、好ましくは4℃以下で、界面活性剤を含有する水溶液に胚芽画分を分散・懸濁させて、洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄することがより好ましい。界面活性剤としては、非イオン性のものが好ましく、非イオン性界面活性剤であるかぎり、広く利用ができる。具体的には、例えば、好適なものとして、ポリオキシエチレン誘導体であるブリッジ (B r i j)、トリトン (T r i t o n)、ノニデット (N o n i d e t) P 4 0、ツイーン (T w e e n) 等が例示される。なかでも、ノニデット (N o n i d e t) P 4 0 が最適である。これらの非イオン性界面活性剤は、例えば0.5%の濃度で使用する事ができる。水又は水溶液による洗浄処理及び界面活性剤による洗浄処理は、どちらか一方でもよし、両方実施してもよい。また、これらの洗浄処理は、超音波処理との組み合わせで実施してもよい。

【0037】

本発明においては、上記のように植物種子を粉碎して得られた粉碎物から植物胚芽を選別した後洗浄して得られた無傷（発芽能を有する）の胚芽を抽出溶媒の存在下に細分化した後、得られるコムギ胚芽抽液を分離し、更に精製することにより無細胞タンパク質合成用コムギ胚芽抽出液を得る。

抽出溶媒としては、緩衝液、カリウムイオン、マグネシウムイオン及び／又はチオール基の還元剤を含む水溶液を用いることができる。また、必要に応じて、カルシウムイオン、L型アミノ酸等をさらに添加してもよい。例えば、2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (H E P E S) -K O H、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、L型アミノ酸及び／又はD T Tを含む溶液や、P a t t e r s o nらの方法を一部改変した溶液 (H E P E S -K O H、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、塩化カルシウム、L型アミノ酸及び／又はジチオスレイトールを含む溶液) を抽出溶媒として使用することができる。抽出溶媒中の各成分の組成・濃度はそれ自体既知であり、無細胞タンパク質合成用のコム

ギ胚芽抽出液の製造法に用いられるものを採用すればよい。

【0038】

胚芽と抽出に必要な量の抽出溶媒とを混合し、抽出溶媒の存在下に胚芽を細分化する。抽出溶媒の量は、洗浄前の胚芽 1 g に対して、通常 0.1 ml 以上、好ましくは 0.5 ml 以上、より好ましくは 1 ml 以上である。抽出溶媒量の上限は特に限定されないが、通常、洗浄前の胚芽 1 g に対して、10 ml 以下、好ましくは 5 ml 以下である。また、細分化しようとする胚芽は従来のように凍結させたものを用いてもよいし、凍結させていないものを用いてもよいが、凍結させていないものを用いるのがより好ましい。

【0039】

細分化の方法としては、摩砕、圧砕、衝撃、切断等、粉碎方法として従来公知の方法を採用することができるが、特に衝撃または切断により胚芽を細分化することが好ましい。ここで、「衝撃または切断により細分化する」とは、植物胚芽の細胞核、ミトコンドリア、葉緑体等の細胞小器官（オルガネラ）、細胞膜や細胞壁等の破壊を、従来の摩砕又は圧砕と比べて最小限に止めうる条件で植物胚芽を破壊することを意味する。

【0040】

細分化する際に用いることのできる装置や方法としては、上記条件を満たすものであれば特に限定されないが、例えば、ワーリングブレンダーのような高速回転する刃状物を有する装置を用いることが好ましい。刃状物の回転数は、通常 1000 rpm 以上、好ましくは 5000 rpm 以上であり、また、通常 3000 rpm 以下、好ましくは 25000 rpm 以下である。刃状物の回転時間は、通常 5 秒以上、好ましくは 10 秒以上である。回転時間の上限は特に限定されないが、通常 10 分以下、好ましくは 5 分以下である。細分化する際の温度は、好ましくは 10℃ 以下で操作が可能な範囲内、特に好ましくは 4℃ 程度が適当である。

【0041】

このように衝撃または切断により胚芽を細分化することにより、胚芽の細胞核や細胞壁を全て破壊してしまうのではなく、少なくともその一部は破壊されるこ

となく残る。即ち、胚芽の細胞核等の細胞小器官、細胞膜や細胞壁が必要以上に破壊されることがないため、それらに含まれるDNAや脂質等の不純物の混入が少なく、細胞質に局在するタンパク質合成に必要なRNAやリボソーム等を高純度で効率的に胚芽から抽出することができる。

【0042】

このような方法によれば、従来の植物胚芽を粉碎する工程と粉碎された植物胚芽と抽出溶媒とを混合してコムギ胚芽抽出液を得る工程とを同時に一つの工程として行うことができるため効率的にコムギ胚芽抽出液を得ることができる。上記の方法を、以下、「ブレンダー法」と称することがある。

次いで、遠心分離等によりコムギ胚芽抽出液を回収し、ゲルろ過等により精製することによりコムギ胚芽抽出液を得ることができる。ゲルろ過としては、例えばセファデックスG-25カラム等のゲルろ過装置を用いて行うことができる。ゲルろ過溶液中の各成分の組成・濃度はそれ自体既知であり、無細胞タンパク合成用のコムギ胚芽抽出液の製造法に用いられるものを採用すればよい。ここで、セファデックスG-25カラムを平衡化するための溶液として、還元剤を含まないもの、具体的には、例えば、HEPES-KOH、酢酸カリウム、酢酸マグネシウム、又はL型アミノ酸を含むものを用いることによれば、抽出液中に含まれていた還元剤のうちの約97%が吸収される。具体的には、コムギ胚芽から還元剤としてDTTを1mM含む抽出液を用いて抽出を行った場合、最終的に約30 μ MのDTTを含むコムギ胚芽抽出液を取得することができる。ただし、還元剤濃度を低下させたコムギ胚芽抽出液は凍結保存によりその活性が著しく低下するため、還元剤の除去工程は翻訳反応に用いる直前に行うことが好ましい。

【0043】

ゲルろ過後の胚芽抽出液には、微生物、特に糸状菌（カビ）などの孢子が混入していることがあり、これら微生物を排除しておくことが好ましい。特に長期（1日以上）の無細胞タンパク質合成反応中に微生物の繁殖が見られることがあるので、これを阻止することは重要である。微生物の排除手段は特に限定されないが、ろ過滅菌フィルターを用いるのが好ましい。フィルターのポアサイズとしては、混入の可能性のある微生物が除去可能なものであれば特に制限はないが、通

常 0.1~1 マイクロメートル、好ましくは 0.2~0.5 マイクロメートルが適当である。ちなみに、小さな部類の枯草菌の胞子のサイズは $0.5\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ であることから、0.20 マイクロメートルのフィルター（例えば Sartorius 社製の MinisartTM 等）を用いるのが胞子の除去にも有効である。ろ過に際して、まずポアサイズの大きめのフィルターでろ過し、次に混入の可能性のある微生物が除去可能であるポアサイズのフィルターを用いてろ過するのが好ましい。

【0044】

このようにして得られた細胞抽出液は、原料細胞自身が含有する又は保持するタンパク質合成機能を抑制する物質（トリチン、チオニン、リボヌクレアーゼ等の、mRNA、tRNA、翻訳タンパク質因子やリボソーム等に作用してその機能を抑制する物質）を含む胚乳がほぼ完全に除去され純化されている。ここで、胚乳がほぼ完全に除去され純化されているとは、リボソームが実質的に脱アデニン化されない程度まで胚乳部分を取り除いたコムギ胚芽抽出液のことであり、また、リボソームが実質的に脱アデニン化されない程度とは、リボソームの脱アデニン化率が 7% 未満、好ましくは 1% 以下になっていることをいう。

【0045】

また、このような細胞抽出液は、低分子のタンパク質合成阻害物質（以下、これを「低分子合成阻害物質」と称することがある）を含有しているため、細胞抽出液の構成成分から、これら低分子合成阻害物質を分子量の違いにより分画排除することが好ましい。排除されるべき物質（低分子阻害物質）の分子量は、細胞抽出液中に含まれるタンパク質合成に必要な因子よりも小さいものであればよい。具体的には、分子量 50,000~14,000 以下、好ましくは 14,000 以下のものが挙げられる。

【0046】

低分子合成阻害物質の細胞抽出液からの排除方法としては、それ自体既知の通常用いられる方法が用いられるが、具体的には透析膜を介した透析による方法、ゲルろ過法、あるいは限外ろ過法等が挙げられる。このうち、透析による方法（透析法）が、透析内液に対しての物質の供給のし易さ等の点において好ましい。

以下、透析法を用いる場合を例に詳細に説明する。

【0047】

透析に用いる透析膜としては、50,000～12,000の排除分子量を有するものが挙げられる、具体的には排除分子量12,000～14,000の再生セルロース膜（Viskase Sales, Chicago社製）や、排除分子量50,000のスペクトラ／ポア6（SPECTRUM LABOTRATORIES INC., CA, USA製）等が好ましく用いられる。このような透析膜中に適当な量の上記細胞抽出液を入れ常法を用いて透析を行う。透析を行う時間は、30分～24時間程度が好ましい。

【0048】

低分子合成阻害物質の排除を行う際、細胞抽出液に不溶性成分が生成される場合には、これを阻害する（以下、これを「細胞抽出液の安定化」と称することがある）ことにより、最終的に得られる細胞抽出液（以下、これを「処理後細胞抽出液」と称することがある）のタンパク質合成活性が高まる。細胞抽出液の安定化の具体的な方法としては、上記した低分子阻害物質の排除を行う際に、少なくとも高エネルギーリン酸化合物、例えばATPまたはGTP等を含む溶液で行う方法が挙げられる。高エネルギーリン酸化合物としては、ATPが好ましく用いられる。また、好ましくは、ATPとGTP、さらに好ましくはATP、GTP、及び20種類のアミノ酸を含む溶液で行う。

【0049】

これらの成分（以下、これを「安定化成分」と称することがある）を含む溶液中で低分子阻害物質の排除を行う場合は、細胞抽出液に予め安定化成分を添加し、インキュベートした後、これを低分子阻害物質の排除工程に供してもよい。低分子合成阻害物質の排除に透析法を用いる場合は、細胞抽出液だけでなく透析外液にも安定化成分を添加して透析を行い低分子阻害物質の排除を行うこともできる。透析外液にも安定化成分を添加しておけば、透析中に安定化成分が分解されても常に新しい安定化成分が供給されるのでより好ましい。このことは、ゲルろ過法や限外ろ過法を用いる場合にも適用でき、それぞれの担体を安定化成分を含むろ過用緩衝液により平衡化した後に、安定化成分を含む細胞抽出液を供し、さ

らに上記緩衝液を添加しながらろ過を行うことにより同様の効果を得ることができる。

【0050】

安定化成分の添加量、及び安定化処理時間としては、細胞抽出液の種類や調製方法により適宜選択することができる。これらの選択の方法としては、試験的に量及び種類をふった安定化成分を細胞抽出液に添加し、適当な時間の後に低分子阻害物質の排除工程を行い、取得された処理後細胞抽出液を遠心分離等の方法で可溶化成分と不溶化成分に分離し、そのうちの不溶性成分が少ないものを選択する方法が挙げられる。さらには、取得された処理後細胞抽出液を用いて無細胞タンパク質合成を行い、タンパク質合成活性の高いものを選択する方法も好ましい。また、上記の選択方法において、細胞抽出液と透析法を用いる場合、適当な安定化成分を透析外液にも添加し、これらを用いて透析を適当時間行った後、得られた細胞抽出液中の不溶性分量や、得られた細胞抽出液のタンパク質合成活性等により選択する方法も挙げられる。

【0051】

このようにして選択された細胞抽出液の安定化条件の例として、具体的には、上記したブレンダー法を用いて調製したコムギ胚芽抽出液で、透析法により低分子阻害物質の排除工程を行う場合においては、そのコムギ胚芽抽出液、及び透析外液中に、ATPを $100\mu\text{M}\sim 0.5\text{mM}$ 、GTPを $25\mu\text{M}\sim 1\text{mM}$ 、20種類のL型アミノ酸をそれぞれ $25\mu\text{M}\sim 5\text{mM}$ 添加して30分～1時間以上の透析を行う方法等が挙げられる。透析を行う場合の温度は、タンパク質合成活性が失われず、かつ透析が可能な温度であれば如何なるものであってもよい。具体的には、最低温度としては、溶液が凍結しない温度で、通常 -10°C 、好ましくは -5°C 、最高温度としては透析に用いられる溶液に悪影響を与えない温度の限界である 40°C 、好ましくは 38°C である。

【0052】

細胞抽出液への安定化成分の添加方法は、特に制限はなく、低分子阻害物質の排除工程の前に添加しこれを適当時間インキュベートして安定化を行った後、低分子合成阻害物質の排除工程を行ってもよいし、安定化成分を添加した細胞抽出

液、及び／または安定化成分を添加した該排除工程に用いるための緩衝液を用いて低分子合成阻害物質の排除工程を行ってもよい。

【0053】

上記した無細胞タンパク質合成用細胞抽出液は、これを上記に記載した範囲の還元剤の濃度範囲に調製し、無細胞タンパク質合成に必要なエネルギー源やアミノ酸、翻訳鋳型、あるいはtRNA等、またジスルフィド結合交換反応を触媒する酵素を必要に応じて添加してそれぞれ選択されたそれ自体既知のシステム、または装置に投入し、タンパク質合成を行うことができる。タンパク質合成のためのシステムまたは装置としては、バッチ法 (Pratt, J. M. et al., Transcription and Translation, Hames, 179-209, B. D. & Higgins, S. J., eds, IRL Press, Oxford (1984))、アミノ酸、エネルギー源等を連続的に反応系に供給する連続式無細胞タンパク質合成システム (Spirin, A. S. et al., Science, 242, 1162-1164 (1988))、透析法 (木川等、第21回日本分子生物学会、WID6)、あるいは重層法 (Sawasaki, T., et al., FEBS Let., 514, 102-105 (2002)) 等が挙げられる。

【0054】

さらには、合成反応系に、鋳型のRNA、アミノ酸、エネルギー源等を必要時に供給し、合成物や分解物を必要時に排出する方法 (特開2000-333673号公報：以下これを「不連続ゲルろ過法」と称することがある) 等を用いることができる。

このうち、アミノ酸やエネルギー源の連続、または不連続供給系を使用することにより、反応を長時間維持させることができ、更なる効率化が可能となるが、弱還元型翻訳反応液を用いてタンパク質合成を行う場合は、バッチ法を用いる方がタンパク質合成効率が高い傾向にあるため好ましい。また、上記に記載のブレンダー法によりコムギ胚芽抽出液を調製した場合にはtRNAを十分に含んでいるため通常これを添加する必要が無い。

【0055】

バッチ法によりタンパク質合成を行う場合には、例えば翻訳鋳型を除いた合成反応液を必要に応じて適当時間プレインキュベートした後に翻訳鋳型を添加してインキュベートすること等により行うことができる。合成反応液としては、翻訳反応液として、例えば、10～50 mM HEPES-KOH (pH 7.8)、55～120 mM 酢酸カリウム、1～5 mM 酢酸マグネシウム、0.1～0.6 mM スペルミジン、各0.025～1 mM L-アミノ酸、20～70 μ M、好ましくは30～50 μ MのDTT、1～1.5 mM ATP、0.2～0.5 mM GTP、10～20 mM クレアチンリン酸、0.5～1.0 U/ μ l RNase inhibitor、0.01～10 μ M タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、及び24～75% コムギ胚芽抽出液（ブレンダー法により調製したもの）コムギ胚芽抽出液を含むもの等が用いられる。

【0056】

このような翻訳反応液を用いた場合プレインキュベートは10～40℃で5～10分間、インキュベートは同じく10～40℃、好ましくは18～30℃、さらに好ましくは20～26℃で行う。反応時間は、反応が停止するまでの時間であるが、バッチ法では通常10分～7時間程度である。

透析法によりタンパク質合成を行う場合には、合成反応液を透析内液とし、透析外液と物質移動が可能な透析膜によって隔離される装置を用いて、タンパク質合成を行う。具体的には、例えば、翻訳鋳型を除いた上記合成反応液を必要に応じて適当時間プレインキュベートした後、翻訳鋳型を添加して、適当な透析容器に入れ反応内液とする。透析容器としては、底部に透析膜が付加されている容器（第一化学社製：透析カップ12, 000等）や、透析用チューブ（三光純薬社製：12, 000等）が挙げられる。透析膜は、10, 000ダルトン以上の分子量限界を有するものが用いられるが、12, 000ダルトン程度の分子量限界を有するものが好ましい。

【0057】

透析外液としては、上記合成反応液から翻訳鋳型を除いたものが用いられる。透析外液は反応速度が低下した時点で、新鮮なものと交換することにより透析効率を上昇させることができる。反応温度、及び時間は用いるタンパク質合成系に

において適宜選択されるが、コムギ胚芽抽出液を用いた系においては通常 10～40℃、好ましくは 18～30℃、さらに好ましくは 20～26℃で 10分～12日間行うことができる。

【0058】

重層法を用いてタンパク質合成を行う場合には、合成反応液を適当な容器に入れ、該溶液上に、上記透析法に記載した透析外液を界面を乱さないように重層することによりタンパク質合成を行う。具体的には例えば、翻訳鋳型を除いた上記合成反応液を必要に応じて適当時間ブレインキュベートした後、翻訳鋳型を添加して、適当な容器に入れ反応相とする。容器としては、例えばマイクロタイタープレート等が挙げられる。この反応相の上層に上記透析法に記載した透析外液（供給相）を界面を乱さないように重層して反応を行う。

【0059】

両相の界面は必ずしも重層によって水平面状に形成させる必要はなく、両相を含む混合液を遠心分離することによって、水平面を形成することも可能である。両相の円形界面の直径が 7mm の場合、反応相と供給相の容量比は 1：4～1：8 が適当であるが、1：5 が好適である。両相からなる界面面積は大きいほど拡散による物質交換率が高く、タンパク質合成効率が上昇する。従って、両相の容量比は、両相の界面面積によって変化する。合成反応は静置条件下で、反応温度、及び時間は用いるタンパク質合成系において適宜選択されるが、コムギ胚芽抽出液を用いた系においては 10～40℃で、好ましくは 18～30℃、さらに好ましくは 20～26℃で、通常 10～17 時間行うことができる。また、大腸菌抽出液を用いる場合、反応温度は 30～37℃が適当である。

【0060】

不連続ゲルろ過法を用いてタンパク質合成を行う場合には、合成反応液により合成反応を行い、合成反応が停止した時点で、鋳型の RNA、アミノ酸、エネルギー源等を供給し、合成物や分解物を排出することによりタンパク質合成を行う。具体的には例えば、翻訳鋳型を除いた上記合成反応液を必要に応じて適当時間ブレインキュベートした後、翻訳鋳型を添加して、適当な容器に入れ反応を行う。容器としては、例えばマイクロプレート等が挙げられる。この反応下では、例

例えば容量の48%容のコムギ胚芽抽出液を含む反応液の場合には反応1時間で合成反応は完全に停止する。このことは、アミノ酸のタンパク質への取りこみ測定やショ糖密度勾配遠心法によるポリリボソーム解析 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 559-564 (2000)) により確認することができる。合成反応の停止した上記反応溶液を、予め上記透析法に記載の透析外液と同様の組成の供給液により平衡化したゲルろ過カラムを通す。このろ過溶液を再度適当な反応温度に保温することにより、合成反応が再開し、タンパク質合成は数時間に渡って進行する。以下、この反応とゲルろ過操作を繰り返す。反応温度、及び時間は用いるタンパク質合成系において適宜選択されるが、コムギ胚芽抽出液を用いた系においては26℃で約1時間ごとにゲルろ過を繰り返すのが好ましい。

【0061】

このような無細胞タンパク質翻訳において、本発明の単鎖抗体に標識化物質を特定の酵素の存在下で結合させる場合には、標識化物質と、それをリンカー部分のポリペプチドに結合し得る酵素の存在下で上記した翻訳反応を行う。具体的には、標識化物質としてビオチンをリンカーに結合させる場合、リンカーに予め挿入したbirAがコードするペプチドを認識してビオチンを結合させる酵素、例えばビオチンリガーゼ (Avidity, LLC社製等) 等の存在下で翻訳反応を行う。ビオチンおよびビオチンリガーゼの添加量は、市販製品 (酵素) に添付されている説明書に記載の量が好ましい。

【0062】

また、標識化物質をタンパク質合成の後に結合する場合には、翻訳反応終了後、翻訳反応液中の単鎖抗体のリンカー部分に、それぞれの標識化物質に適した方法により結合してもよいし、下記の方法で単鎖抗体を精製した後に、それぞれの標識化物質に適した方法により結合してもよい。

かくして得られた本発明の標識化単鎖抗体は、それ自体既知の方法により確認することができる。具体的には例えば、アミノ酸のタンパク質への取りこみ測定や、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動による分離とクマシーブリアントブルー (CBB) による染色、オートラジオグラフィー法 (Endo, Y. et

al., J. Biotech., 25, 221-230 (1992); Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97, 559-564 (2000) 等を用いることができる。

【0063】

また、かくして得られる反応液には、目的の標識化単鎖抗体が高濃度に含まれているので、透析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ゲルろ過等のそれ自体既知の分離、精製法により、該反応液から目的の標識化単鎖抗体を容易に取得することができる。

【0064】

(3) 標識化抗体の利用

本発明の標識化単鎖抗体は、抗原との結合性を解析することにより抗原抗体反応の解析方法に用いることができる。具体的には、標識化物質が固相化物質である場合には、該抗体を固相化して（固相化単鎖抗体）抗原との結合性を解析し、標識化物質がシグナル物質である場合は、抗原との結合性を溶液中で解析することにより抗原抗体反応を解析することができる。

【0065】

固相化単鎖抗体の作製方法としては、適当な基盤に前記したアダプター物質を結合させ、該基盤に固相化単鎖抗体を接触させ、結合しなかった抗体を除去する方法等が挙げられる。基盤としては、抗原抗体反応の解析方法あるいは装置に適したものをを用いることができる。具体的には、固相酵素免疫検定法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) : Crowther, J. R., Methods in Molecular Biology, 42, (1995)) をにより解析する場合、通常ELISA法により用いられるプラスチック製のマイクロタイタープレートが好ましい。表面プラズモン共鳴法 (Cullen, D. C. et al., Biosciences, 3 (4), 211-225 (1987-88)) を用いる場合には、ガラス等の透明基盤上に金、銀、白金等の金属薄膜が構成されたものが好ましい。また、エバネッセント場分子イメージング法 (Funatsu, T., et al., Nature, 374, 555-559 (1995)) を用いる場合に

は、ガラス等の透明体が好ましく、さらに好ましくは石英ガラス製のものが用いられる。蛍光イメージングアナライズ法を用いる場合には、通常タンパク質等を固定化するのに用いられるニトロセルロースメンブレンやナイロンメンブレン、あるいはプラスチック製のマイクロタイタープレート等も用いることができる。また、複合糖質（例えば、アガロースとセファロース）、アクリル樹脂（例えば、ポリアクリルアミドとラテックスビーズ）、マグネットビーズ、シリコンウェハー等も基盤として用いることができる。

【0066】

このような基盤へのアダプター物質の結合は、それ自体既知の通常使用される方法を用いることができる。具体的には、ジアゾ法、ペプチド法（酸アミド誘導体、カルボキシクロライド樹脂、無水マレイン酸誘導体、イノシアナート誘導体、臭化シアン活性化多糖体、セルロースカルボナート誘導体等を用いる方法、アルキル法、架橋試薬を用いる方法、Ugi反応による方法等が挙げられる。また、ガラス等の基盤を用いる場合には、物理的に吸着させる方法も用いられる。さらには、ストレプトアビジン-マグネット（Promega社製）のように市販のものをを用いることもできる。

【0067】

かくして得られた標識化単鎖抗体を、1つまたはそれ以上の既知抗原等の被検物質を含む溶液と接触させ、抗原抗体反応を解析することにより、該抗原に対する結合特異性を有する抗体を同定することができる。この抗原はタンパク質であってもよいし、また有機化合物、炭水化物、核酸などであってもよい。これらは、単離されたものでもよいし、また、組換えまたは天然に存在するものであってもよい。使用される抗原の量は、約 $1 \sim 100 \text{ ng} / \mu\text{l}$ の範囲が好ましい。抗原抗体反応に要する時間は、通常5分間～24時間の範囲であり、一般には0.5～2時間が好ましい。

【0068】

単鎖抗体を固相化した場合には、非特異的吸着を減少させるために、当該分野において周知の方法を用いることができる。具体的には、ウシ血清アルブミン（BSA）、還元低脂肪乳、サケ精子DNA、ブタヘパリンなどを用いてアレイ固

体支持体をプレコーティングする方法を含む (Ausubel, . et al . , Short Protocols in Molecular Biology, 3rd. edition (1995))。

【0069】

抗原抗体反応の後、固相化単鎖抗体の場合は、該抗体を結合した固相を界面活性剤等を含む生化学的に用いられる緩衝液により洗浄する。緩衝液の組成および洗浄の回数等は抗原抗体反応の強さ等により適宜選択される。

抗原抗体反応の解析は、それ自体既知の通常用いられる方法により行うことができる。具体的には、ELISA法、表面プラズモン共鳴法、エバネッセント場分子イメージング法、蛍光イメージングアナライズ法、あるいは放射性同位体ラベルを用いた方法等も挙げられる。

【0070】

抗原等の被検物質を含む溶液とは、抗原を含む可能性があればよい。具体的には、例えば、血液等の体液、細菌の細胞壁抽出物、タンパク質混合物等が挙げられる。

本発明の標識化単鎖抗体を用いた抗原抗体反応の解析によれば、例えば、ヒトの自己抗体の有無や、がん細胞特異抗原等を解析、診断することができる。

【0071】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例により限定されるものではない。

実施例 1 ビオチン化抗サルモネラ単鎖抗体の作製

(1) サルモネラ単鎖抗体、およびリンカーをコードするDNAの作製

本発明の単鎖抗体として、抗サルモネラ単鎖抗体を選択し、以下の実験を行った。該抗体は既にX線立体構造が解析され、糖鎖に対する分子認識が詳細に調べられている (Cygl er, M. , et al . , Science, 253, 442-445 (1991); Bundle, D. R. et al, Biochemistry, 33, 5172-5182 (1994))。サルモネラ細菌の細胞表層には、リボ多糖が存在し、抗サルモネラ抗体は、このリボ多糖の最も細胞

外に位置するO-抗原に結合する (Anand, N. N., et al., Protein Engin., 3, 541-546 (1990))。このO-抗原に対して特異的に結合する抗原認識部位であるVL鎖とVH鎖を特定のリンカーでつなげた単鎖抗体を大腸菌で大量発現させた報告がある (Anand, N. N., et al., J. Biol. Chem., 266, 21874-21879 (1991))。単鎖抗体を活性な状態で合成するためには、VL鎖とVH鎖に1個ずつ存在するジスルフィド結合の形成が不可欠である (Zdanov, A. L. Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91, 6423-6427 (1994)) ため、該単鎖抗体を本発明の方法の対象とした。

【0072】

抗サルモネラ単鎖抗体をコードするDNAは、野生型のサルモネラO-抗原に対する単鎖抗体をコードするDNAを含むプラスミド (Anand, N. N., et al., J. Biol. Chem., 266, 21874-21879 (1991)) を鋳型として、配列番号2及び3に記載の塩基配列からなるプライマーを用いてポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) を行った。取得されたDNA断片をpGEMT-easyベクター (Promega社製) に挿入した後、BglII及びNotIで制限酵素処理した。得られたDNA断片を予め同じ制限酵素で処理したpEUベクターに挿入した。このプラスミドをテンプレートとして配列番号4及び5に記載の塩基配列からなるプライマーを用いてPCRを行い、ストップコドンを導入した。ここで作製したプラスミドをscfv-pEUと称する。

【0073】

次にリンカー部分にビオチンリガーゼの認識配列をコードするDNA配列 (配列番号1) を挿入したDNAを作製した。まず、上記で作製したプラスミドscfv-pEUを鋳型として、配列番号6及び7に記載の塩基配列からなるプライマーによりLA Taq (TAKARA社製) キットを用いてPCRを行った。PCR反応液は、5 μ l 10 \times LA buffer、5 μ l 25mM塩化マグネシウム、8 μ l 2.5mM dNTP、各1 μ l 20 μ Mプライマー、

0.1 ng 鑄型プラスミド/50 μ l に調製し、94℃1分×1サイクル、94℃45秒/55℃1分/72℃1分30秒×30サイクル、72℃5分の反応を行った。増幅されたDNA断片は、常法に従い、KOD T4 polymerase (NEB社製) により末端の平滑化を行ったのち、Polynucleotide kinase (NEB社製) によるリン酸化後、Ligation High (東洋紡社製) により Self Ligation を行い、環状のプラスミド (図1：以下、これを「scFv-biotin-pEU」と称することがある) を作製した。

【0074】

(2) 弱還元型無細胞タンパク質合成用細胞抽出液の調製

北海道産チホクコムギ種子 (未消毒) を1分間に100gの割合でミル (Fritsch社製：Rotor Speed mill pulverisette 14型) に添加し、回転数8,000rpmで種子を温和に粉碎した。篩いで発芽能を有する胚芽を含む画分 (メッシュサイズ0.7~1.00mm) を回収した後、四塩化炭素とシクロヘキサンの混合液 (容量比=四塩化炭素：シクロヘキサン=2.4：1) を用いた浮選によって、発芽能を有する胚芽を含む浮上画分を回収し、室温乾燥によって有機溶媒を除去した後、室温送風によって混在する種皮等の不純物を除去して粗胚芽画分を得た。

【0075】

次に、ベルト式色彩選別機BLM-300K (製造元：株式会社安西製作所、発売元：株式会社安西総業) を用いて、次の通り、色彩の違いを利用して粗胚芽画分から胚芽を選別した。この色彩選別機は、粗胚芽画分に光を照射する手段、粗胚芽画分からの反射光及び/又は透過光を検出する手段、検出値と基準値とを比較する手段、基準値より外れたもの又は基準値内のものを選別排除する手段を有する装置である。

【0076】

色彩選別機のベージュ色のベルト上に粗胚芽画分を1000乃至5000粒/cm²となるように供給し、ベルト上の粗胚芽画分に蛍光灯で光を照射して反射光を検出した。ベルトの搬送速度は、50m/分とした。受光センサーとして、

モノクロのCCDラインセンサー（2048画素）を用いた。

まず、胚芽より色の黒い成分（種皮等）を排除するために、胚芽の輝度と種皮の輝度の間に基準値を設定し、基準値から外れるものを吸引により取り除いた。次いで、胚乳を選別するために、胚芽の輝度と胚乳の輝度の間に基準値を設定し、基準値から外れるものを吸引により取り除いた。吸引は、搬送ベルト上方約1 cm位置に設置した吸引ノズル30個（長さ1 cm当たり吸引ノズル1個並べたもの）を用いて行った。

【0077】

この方法を繰り返すことにより胚芽の純度（任意のサンプル1 gあたりに含まれる胚芽の重量割合）が98%以上になるまで胚芽を選別した。

得られたコムギ胚芽画分を4℃の蒸留水に懸濁し、超音波洗浄機を用いて洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄した。次いで、ノニデット（Nonidet：ナカライ・テクトニクス社製）P40の0.5容量%溶液に懸濁し、超音波洗浄機を用いて洗浄液が白濁しなくなるまで洗浄してコムギ胚芽を得、以下の操作を4℃で行った。

【0078】

洗浄した胚芽湿重量に対して2倍容量の抽出溶媒（80 mM HEPES-KOH（pH 7.8）、200 mM酢酸カリウム、10 mM酢酸マグネシウム、8 mMジチオスレイトール、（各0.6 mMの20種類のL型アミノ酸を添加しておいてもよい））を加え、ワーリングブレンダーを用い、5,000～20,000 rpmで30秒間ずつ3回の胚芽の限定破碎を行った。このホモジネートから、高速遠心機を用いた30,000×g、30分間の遠心により得られる遠心上清を再度同様な条件で遠心し、上清を取得した。本試料は、-80℃以下の長期保存で活性の低下は見られなかった。取得した上清をポアサイズが0.2 μmのフィルター（ニューステラディスク25：倉敷紡績社製）を通し、ろ過滅菌と混入微細塵芥の除去を行った。

【0079】

次に、このろ液をあらかじめ溶液（40 mM HEPES-KOH（pH 7.8）、100 mM酢酸カリウム、5 mM酢酸マグネシウム、各0.3 mMの20

種類L型アミノ酸混液（タンパク質の合成目的に応じて、アミノ酸を添加しなくてもよいし、標識アミノ酸であってもよい）で平衡化しておいたセファデックスG-25カラムでゲルろ過を行った。得られたろ液を、再度30,000×g、30分間の遠心し、回収した上清の濃度を、A260nmが90~150（A260/A280=1.4~1.6）に調整した後、下記の透析処理やタンパク質合成反応に用いるまで、-80℃以下で保存した。

【0080】

（3）弱還元型翻訳反応液を用いたタンパク質合成（翻訳時にビオチンおよびビオチンリガーゼを添加した場合）

上記（1）で取得された翻訳鋳型DNAについて、SP6 RNA polymerase（TOYOBO社製）を用いて転写を行った。反応液としては、80mM HEPES-KOH（pH7.6）、16mM酢酸マグネシウム、2mMスペルミジン、10mM DTT、NTPs各2.5mM、0.8U/μl RNase inhibitor、50μg/ml プラスミド、及び1.2U/μl SP6 RNA polymerase/ddw 400μlを用いた。37℃で2時間インキュベートした後、フェノール/クロロフォルム抽出、NICK column（Amersham Pharmacia社製）による精製を行い、エタノール沈殿後、沈殿を精製水35μlに溶解した。

【0081】

取得されたmRNAを用いて、翻訳反応を行った。翻訳反応液は、1.2mM ATP、0.25mM GTP、15mMクレアチンリン酸、0.4mMスペルミジン、29mM HEPES-KOH（pH7.6）、95mM酢酸カリウム、2.7mM酢酸マグネシウム、0.23mM L型アミノ酸、0.58U/μl RNase inhibitor（Promega社製）、4nCi/μl ¹⁴C-Leu、7.5μg mRNA、0.5μM PDI、19.5μMビオチン（ナカライ）、19.5μg/μlビオチンライゲース（avidity社製）、および12μlコムギ胚芽抽出液で、反応は26℃で3時間バッチ法により行った。コントロールとして、ビオチンを添加しない翻訳反応も行った。

【0082】

翻訳反応3時間後の反応液を15,000rpm、10分間の遠心分離によって可溶化成分を分離し、残存する未反応のビオチンを50mM Tris (pH 8.0) で平衡化したG-25スピンカラムにより除去した。スピンカラムの溶出液、20 μ lを同量の50mM Tris (pH 8.0) 緩衝液で希釈後、ストレプトアビジンマグネットビーズ (Promega社製) 5 μ lを添加し、室温で穏やかに混合した。磁場によりマグネットビーズを回収した後、上清画分を取得し、SDS-PAGEにより分離した後、オートラジオグラフィにより抗サルモネラ単鎖抗体の量を測定した。この結果を図2のco-transl. biotinylationに示す。図からも明らかなように、ビオチン及びビオチンリガーゼの存在下で翻訳を行ったもの(図中: +biotin)は、ストレプトアビジンとの結合によってマグネットビーズについて回収されたものが多く、逆にビオチンを添加しないで行ったもの(-biotin)は、マグネットビーズに結合した抗体がほとんどないことが示された。このことから、上記した方法により抗サルモネラ単鎖抗体にビオチンが結合していることが明らかとなった。

【0083】

(4) 弱還元型翻訳反応液を用いたタンパク質合成(翻訳反応後にビオチンおよびビオチンリガーゼを添加した場合)

上記(1)～(3)に記載した抗サルモネラ単鎖抗体の作製方法と同様にして、ビオチン及びビオチンリガーゼを翻訳反応開始から3時間後に添加した結果を図2のpost-transl. biotinylationに示す。図から明らかなように、ビオチンを添加したもの(+)もしないもの(-)も、マグネットビーズについて除去されたビオチン化抗体量はほとんど無いことがわかった。このことから、ビオチンリガーゼおよびビオチンの添加は、翻訳反応中に行うことが好ましいことがわかった。

【0084】

実施例2 ビオチン化単鎖抗体の固相化及び抗原抗体反応の解析

(1) アルデヒド化サルモネラO-抗原の調製

リポポリサッカライド (SIGMA社製) 20mg (2.8 μ mol) を0.

25 M水酸化ナトリウム水溶液 $20\ \mu\text{l}$ に溶解し、 56°C にて1時間攪拌した。蒸留水に対して透析後、メタ過葉酸ナトリウム $200\ \text{mg}$ ($0.8\ \text{mmol}$) を添加し、遮光下にて5分間攪拌した。エチレングリコール $1\ \text{ml}$ をさらに添加して1時間攪拌した後、これを蒸留水に対して透析を行い、凍結乾燥によりアルデヒド型サルモネラ糖鎖の粉末を得た。これを $0.2\ \text{ml}$ の $20\ \text{mM}$ ホウ酸ナトリウム緩衝液 $\text{pH } 9.0$ に溶解した ($10\ \text{mg}/\text{ml}$) に溶解した。アミノ化マグネットビーズ ($\text{NH}_2\text{-Mag}$: Polyscience社製) $0.1\ \text{ml}$ を $0.4\ \text{ml}$ の同緩衝液により3回洗浄、平衡化した後、上記アルデヒド型サルモネラ糖鎖の溶液に添加し、6時間室温にて反応を行った。マグネットビーズを同緩衝液 $0.4\ \text{ml}$ で3回洗浄した。糖鎖のマグネットビーズ上への固定化率は、上清に残存した糖鎖をフェノール/硫酸法で定量することにより求めた。ここで、該糖鎖のマグネットビーズへの結合率は 40% ($0.13\ \mu\text{mol}$ サルモネラ糖鎖/ $100\ \mu\text{l}$ マグネットビーズ) であった。

【0085】

(2) ビオチン化抗サルモネラ単鎖抗体とサルモネラ糖鎖との結合

実施例1に記載の方法によりビオチン化単鎖抗体を合成した後 ($\text{total } 38\ \mu\text{l}$)、 $10\ \text{mM}$ PBST ($\text{pH } 8.0$)、 $0.6\ \text{mM}$ CaCl_2 で平衡化した G-25 spin column により過剰のビオチンをゲルろ過した。そのタンパク質溶液 $40\ \mu\text{l}$ を予め $0.6\ \text{mM}$ CaCl_2 を含むコムギ胚芽抽出液 $25\ \mu\text{l}$ で洗浄しておいた $10\ \mu\text{l}$ の上記(1)で作製した固相化サルモネラ抗原 (Sal-Mag) と共に $96\ \text{well}$ マイクロプレート上に添加した。15分間穏やかに混合した後、 $40\ \mu\text{l}$ の $0.15\ \text{M}$ $\text{NaCl}/10\ \text{mM}$ PBST ($\text{pH } 8.0$) で4回洗浄し、最後に同量の $0.1\ \text{M}$ glycine-HCl ($\text{pH } 2.4$) で4回溶出を行った。初めの洗浄により抗原と結合しなかった単鎖抗体が溶出し、後の溶出により抗原と結合した単鎖抗体が溶出される。各フラクション ($5\ \mu\text{l}$) 中のタンパク質量は、 $14\ \text{C}$ カウントにより求めた。この結果を図3示す。ここには、ビオチン化単鎖抗体が抗原特異性を保持していることを確認する目的で、変異体 G102D を同様にビオチン化した場合の結合結果も示した。図から明らかなように、野生型 (Wild type)

の場合、pH酸性溶液で溶出される活性画分 (no. 6) は、全抗体量の5割近く存在するのに対し、変異型G102Dの場合、活性画分は全く存在せず、ほとんどがno. 1の素通り画分に出ている。この結果は、ビオチン化単鎖抗体が、本来の抗原結合活性を保持していることを示すものであり、co-translationalなビオチン化は、抗原結合活性を全く損なうことなく進行することが支持された。

【0086】

(3) 生体分子間相互作用解析装置 (Iasys) による解離平衡定数の測定

まず、ストレプトアビジン (0.1 mg/ml: ナカライ社製) をビオチンキュベット (Affinity Sensors社製) に固定化した (固定化量: 674 arc sec.、27.2 ng、0.97 pMol)。次に、実施例1で調製したビオチン化単鎖抗体を、上記(2)の方法により固相化サルモネラ糖鎖抗原 (Sal-Mag) を用いて精製した。14C dpm値から換算して8.4 pMol/50 μ lの精製ビオチン化単鎖抗体が得られた。この50 μ l分を、上記キュベットに添加し、ストレプトアビジン上に固定化した (固定化量: 433.6 arc sec., 11.5 ng, 0.4 pMol)。ここへ、様々な濃度のサルモネラ糖鎖 (2.4、4.8、9.7、12.9、19.4 μ M) を添加することにより、会合および解離曲線を測定した。この結果を図4に示し、さらに該曲線から求めた解離平衡定数を表1に示す。また、表1には、同様の方法で大腸菌生細胞を使用して合成した単鎖抗体による値 (MacKenzie, C. R. et al., J. Biol. Chem., 271, 1527-1533 (1996)) も比較のため記載した。図4のresponse曲線から明らかなように、ビオチン化単鎖抗体は、ストレプトアビジン上へ固定化でき、なおかつ抗原を結合しうる機能を保持していることが示された。表1に示すように、この曲線をもとに解離平衡定数Kdを算出した結果、 10^{-7} Mのオーダーであることが判明した。この結果から、実施例1で調製し、ビオチンとストレプトアビジンの結合により固相化した単鎖抗体は、完全抗サルモネラ抗体IgGと同等のKd値を有することが明かとなった。

【0087】

【表 1】

抗体	K_D (M)	k_{ass} (s^{-1})	k_{diss} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	S
無細胞系	5.1×10^{-7}	0.8×10^{-2}	4.4×10^4	
in vivo 系	6.5×10^{-6}	3.1×10^{-1}	1.8×10^4	
IgG	1.4×10^{-7}	1.2×10^{-2}	8.7×10^4	

【0088】

比較例 1 ビオチンの結合位置による固相化効率の検討

単鎖抗体への化学結合によるビオチンの付加

本方法は、続生化学実験講座、免疫生化学研究法（日本生化学会、東京化学同人（1986））の「抗体標識法に記載の方法を用いた。

実施例 1 に記載の方法で、翻訳反応時にビオチンリガーゼ及びビオチンを添加しないで合成した反応液を、15,000 rpm、10 分間の遠心を行い、上清を取得した。上清の可溶画分 25 μl を同量の 1M 炭酸水素ナトリウム溶液で希釈した後、G-25 セファデックスカラムにより緩衝液を交換し、1 μl の NH S-biotin (N-hydroxysuccinimide-biotin、50 mg/ml DMSO) を添加した。これを 4℃で一晩反応させた後、以下に示すように抗原との結合性を解析した。

【0089】

抗原との結合活性の解析

上記（1）で調製した反応液 30 μl を 10 mM PBST (pH 8.0)、0.6 mM CaCl_2 で平衡化した G-25 spin column により過剰のビオチンをゲルろ過した。そのタンパク質溶液 40 μl を予め 0.6 mM

CaCl_2 を含むコムギ胚芽抽出液 25 μl で洗浄しておいた 10 μl の上記実施例 2（1）で作製した固相化サルモネラ糖鎖抗原 (Sal-Mag) と共に 96 well マイクロプレート上に添加した。15 分間穏やかに混合した後、4

0 μ l の 0.15M NaCl / 10mM PBST (pH 8.0) で 4 回洗浄し、最後に同量の 0.1M glycine-HCl (pH 2.4) で 4 回溶出を行った。この結果を図 5 に示す。活性の保持した抗体であれば、後半の酸性緩衝液により溶出されるはずであるが、図から明らかなように、フラクション番号 10 ~ 13 にはタンパク質の存在はみられず、1 番目の素通り画分に大半が存在した。このことは、上記の化学的方法で作製したビオチン化単鎖抗体は抗原結合活性を失っていることを示している。

【0090】

実施例 3 ポリヒスチジンペプチドを挿入した単鎖抗体の作製および固相化

(1) ポリヒスチジンペプチドをリンカー部分に含む単鎖抗体の作製

実施例 1 (1) に記載の scfv-pEU を鋳型として、配列番号 8 および 9 に記載の塩基配列からなるプライマーにより LA taq (TAKARA 社製) キットを用いて PCR を行った。PCR 反応液は、5 μ l 10 \times LA buffer、5 μ l 25mM 塩化マグネシウム、8 μ l 2.5mM dNTP、各 1 μ l 20 μ M プライマー、0.1 ng 鋳型プラスミド / 50 μ l に調製し、94 $^{\circ}$ C 1 分 \times 1 サイクル、94 $^{\circ}$ C 45 秒 / 55 $^{\circ}$ C 1 分 / 72 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒 \times 30 サイクル、72 $^{\circ}$ C 5 分の反応を行った。増幅された DNA 断片は、常法に従い、KOD T4 polymerase (NEB 社製) により末端の平滑化を行ったのち、Polynucleotide kinase (NEB 社製) によるリン酸化後、Ligation high (東洋紡社製) により Self Ligation を行い、環状のプラスミド (図 1 : 以下、これを「scFV-pHIS-pEU」と称することがある) を作製した。

【0091】

このプラスミドを鋳型として、実施例 1 (3) に記載の方法により転写し、mRNA を精製した後に、翻訳反応液中の DTT を 200 μ M のメルカプトエタノールに換えて翻訳反応を行った。翻訳反応 3 時間後の反応液を 15,000 rpm、10 分間の遠心分離によって可溶化成分を分離し、過剰量のメルカプトエタノールを 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)、500mM NaCl、5% Glycerol (Binding buffer) で平衡化した G-25 スピ

ンカラムにより除去した。

【0092】

スピンカラムの溶出液、 $20\mu\text{l}$ を同量のBinding bufferで希釈後、予めbinding buffer $150\mu\text{l}$ で6回洗浄したニッケルカラム (Metal affinity resin: TALON社製) $200\mu\text{l}$ (50% resin) に $80\mu\text{l}$ 添加し、室温で1時間インキュベートした。このカラムを $150\mu\text{l}$ の50mMリン酸緩衝液 (pH 7.0)、500mM NaCl、5% Glycerol、6mM Imidazole (washing buffer) で4回洗浄し (図中w1~w4)、さらに $150\mu\text{l}$ の50mMリン酸緩衝液 (pH 7.0)、500mM NaCl、150mM Imidazole (elution buffer) で5回溶出 (図中e1~e5) を行った。各フラクションに含まれる単鎖抗体の量は、 ^{14}C dpm値により測定した。この結果を図6に示す。図中、Cは、カラムにかける前のタンパク質含有液の全量中の ^{14}C dpm値を示す。グラフの横軸は、フラクション番号を示し、w1~w4は、washing bufferにより溶出されたフラクション中の、またe1~e5はelution bufferにより溶出されたフラクション中の ^{14}C dpm値を示す。ETはe1~e5中の ^{14}C dpm値の合計を示す。

【0093】

フラクション番号e1~e5は、ニッケルと特異的に結合するポリヒスチジンペプチドを含む単鎖抗体の存在を示している。図から明らかなように、全合成量の約50%近くの単鎖抗体は、ニッケルカラムにより精製できることがわかった。精製した単鎖抗体は、抗原結合活性を保持していることも実施例2に記載の方法により確認できた。この結果は、ポリヒスチジンペプチドをリンカー部分に組み込んだ単鎖抗体は、ニッケル固相上に活性を保持した状態で固定化しうることを示している。

【0094】

【発明の効果】

本発明によれば、標識化された単鎖抗体であって、抗原との特異的結合活性を

保持したものが提供される。該単鎖抗体によれば、標識化物質を介して固相に結合させることも可能であり、抗体チップ等を作製することができる。このような単鎖抗体は、分子内のジスルフィド結合が保持されるような無細胞タンパク質翻訳系により合成することにより、大腸菌のような生細胞内で合成されたものに比べて抗原との特異的結合性が高いものが提供される。

【0095】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yaeta Endo

<110> Mitsubishi Chemical Corporation

<120> Labeled single chain variable fragments

<130> J09065

<160> 9

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 1

ggtttaaag atatttttga agctcaaaaa attgaatggc atgaa 45

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 2

ctaccagatc tgccatgcag atcggttgta cccagg

36

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

gcttgggccc agagctcacg gtcaggctcg

30

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

ggctaagagc tcacggtcag gctcg

25

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

gcctgcagct ggcgccatcg at

22

<210>6

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400>6

caaaaaattg aatggcatga accgccgagc tccaac

36

<210>7

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

agcttcaaaa atatcattta aaccgcgacgg gctgctttt

39

<210>8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

catcaccatc accatcaccc gccgagctcc

30

<210>9

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

ggtaaccgac gggctg

16

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の単鎖抗体の翻訳鋳型の構造を示す図である。

【図 2】

ビオチンリガーゼによる単鎖抗体へのビオチンの結合度を示す電気泳動写真である。

【図 3】

本発明の標識化単鎖抗体の抗原への特異的結合度を示す図である。

【図 4】

本発明の標識化単鎖抗体と抗原との会合解離曲線を示す図である。

【図 5】

リンカー部分以外にビオチンを結合させた単鎖抗体と抗原との結合度を示す図である。

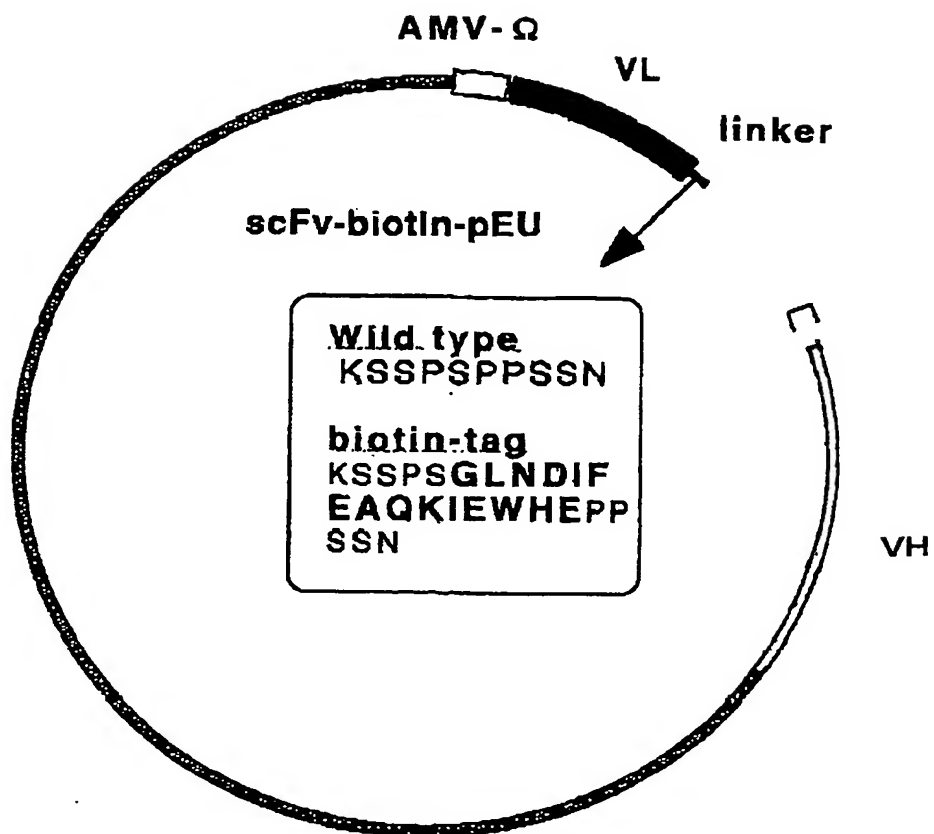
【図 6】

ポリヒスチジンペプチドをリンカー部分に有する単鎖抗体のニッケルカラムへの結合度を示す図である。

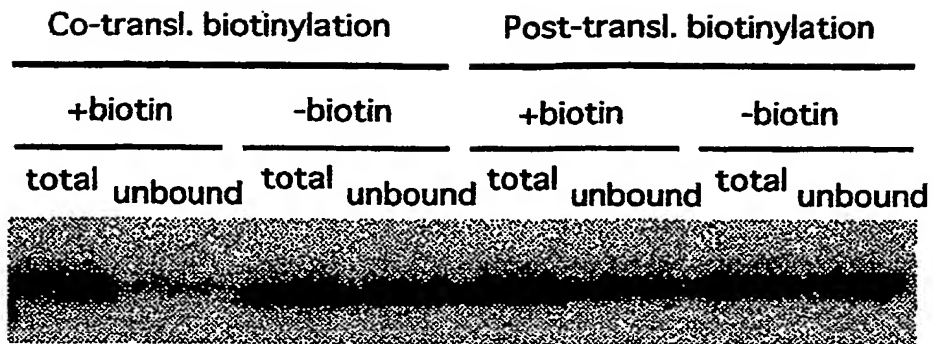
【書類名】

図面

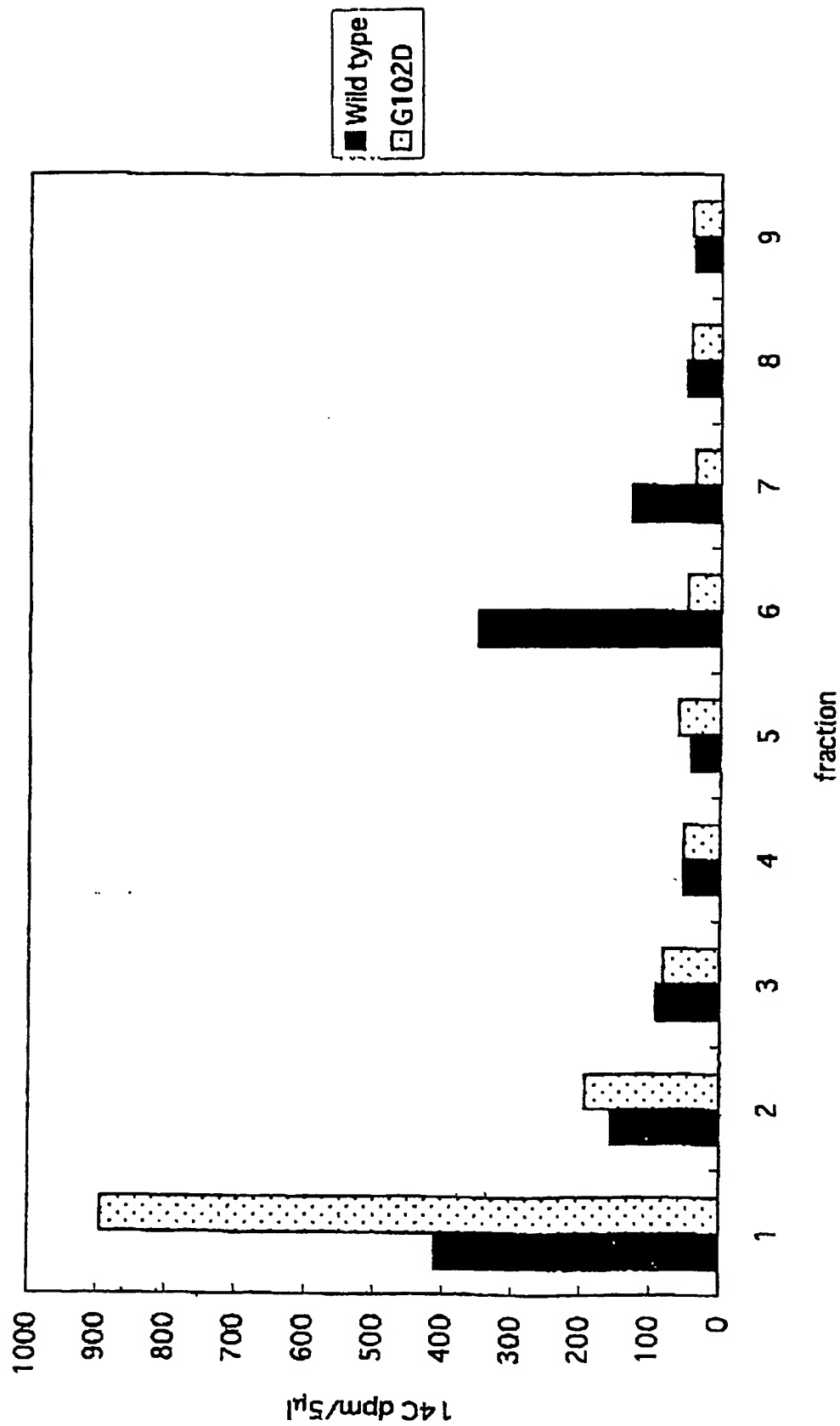
【図 1】



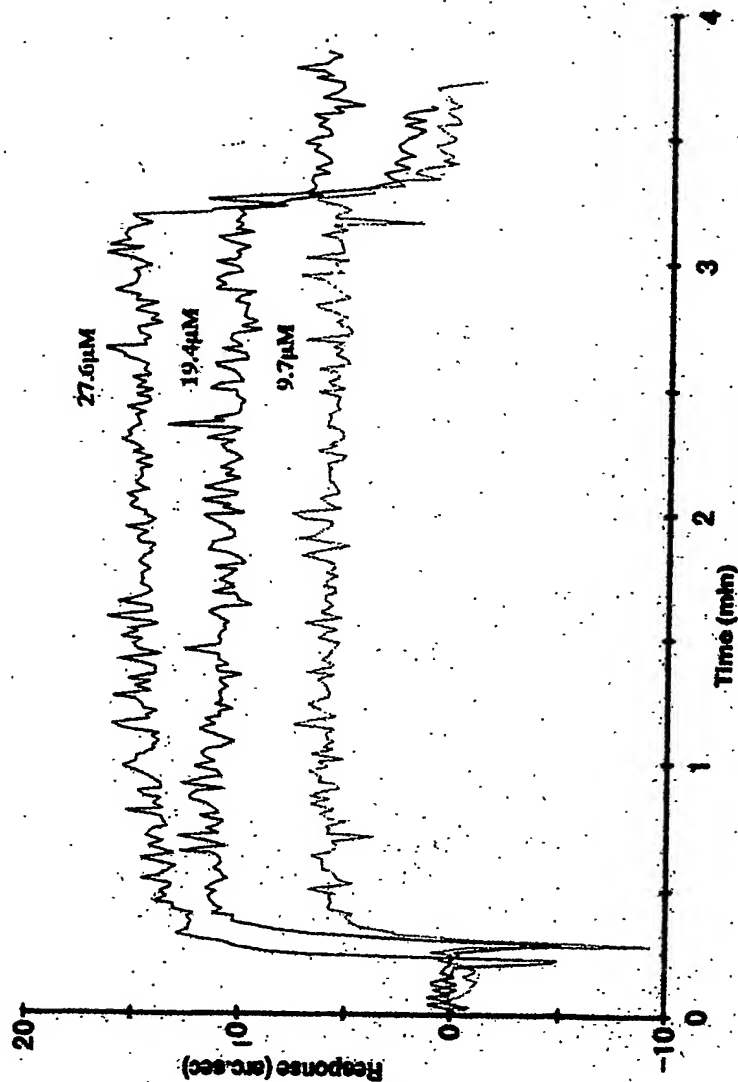
【図 2】



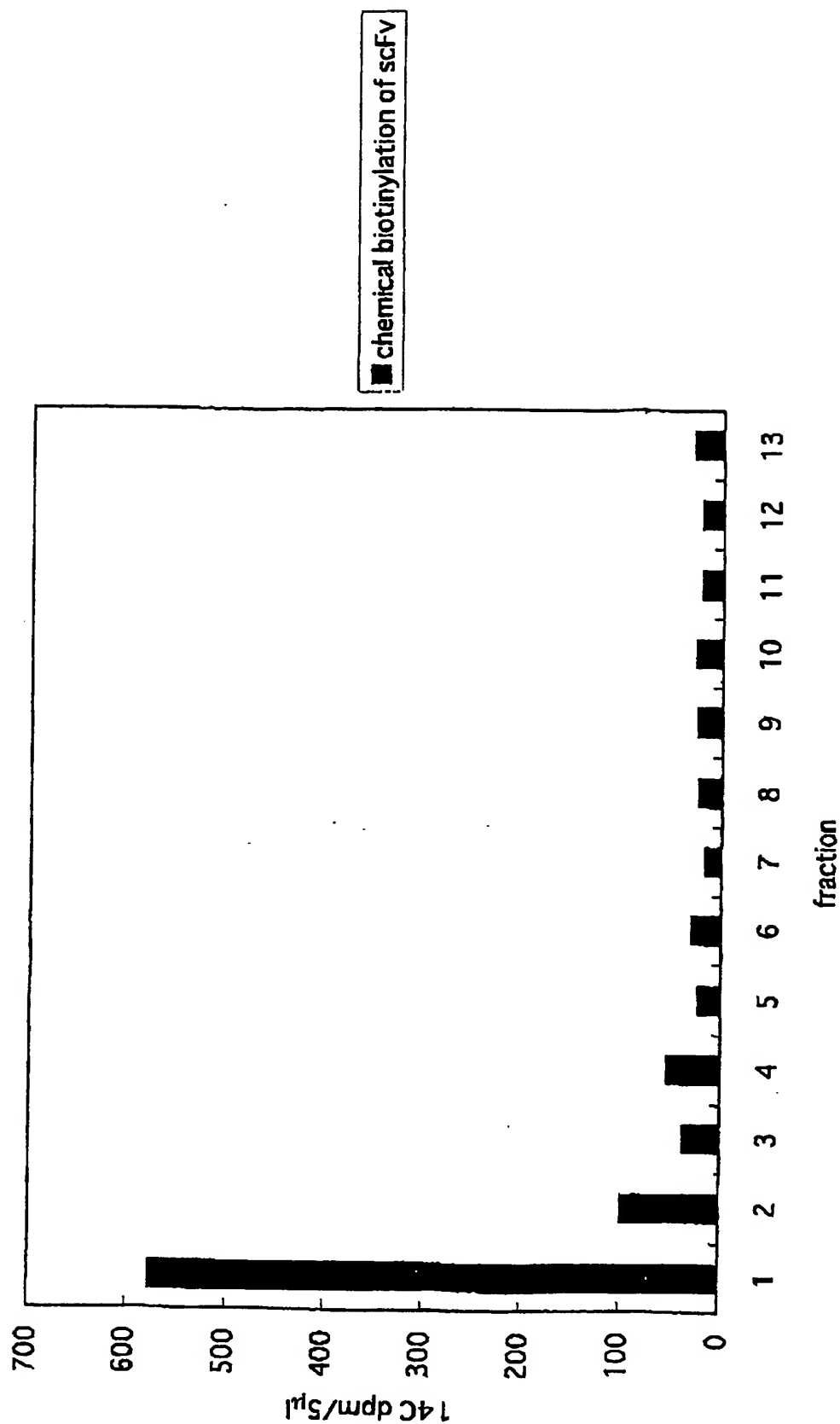
【図 3】



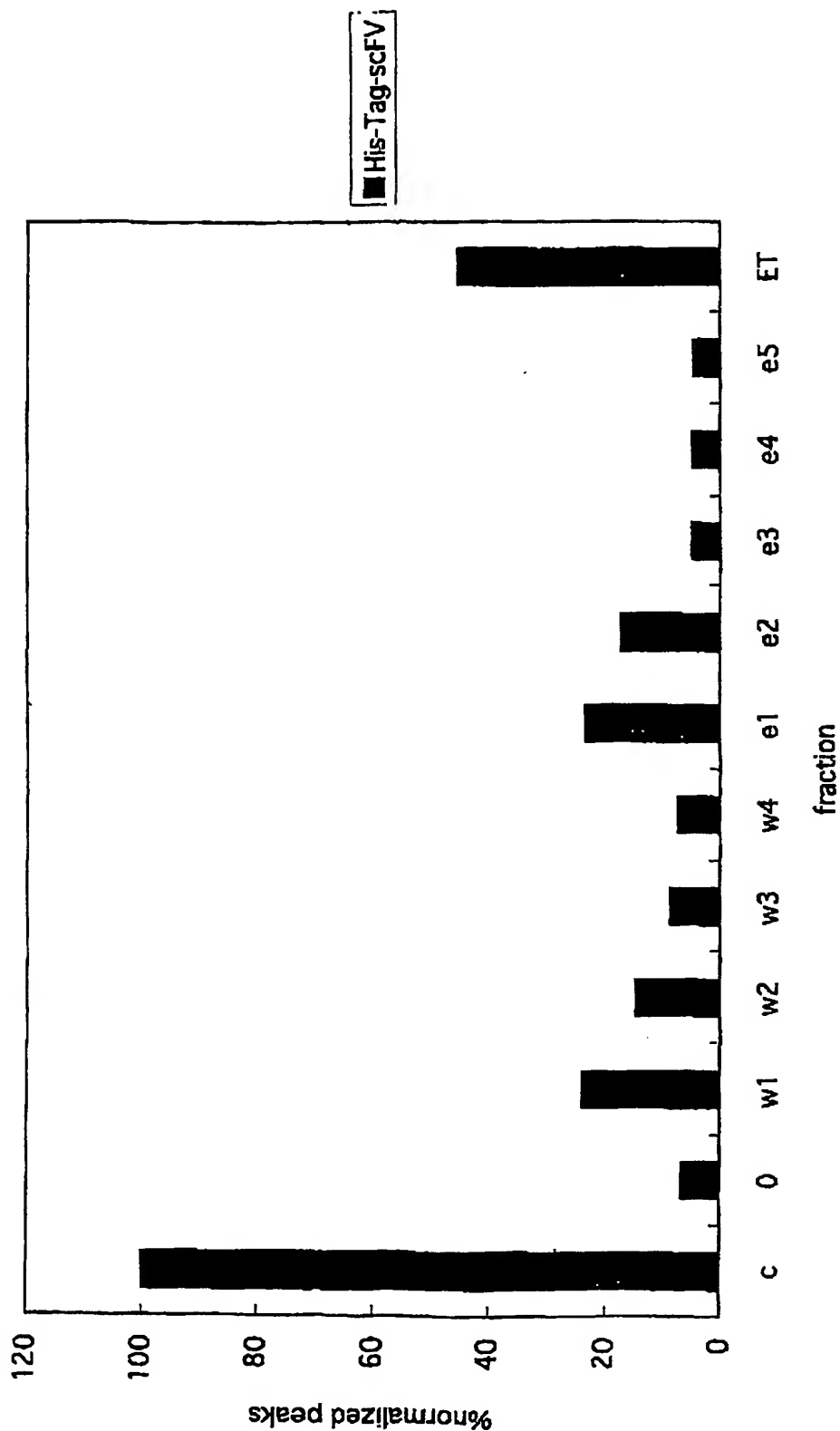
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、単鎖抗体の抗原との特異的結合活性を保持したまま標識化物質を結合した標識化単鎖抗体を提供する。

【解決手段】 本発明の標識化単鎖抗体は、単鎖抗体のリンカー部分に標識化物質を結合することにより作製することができる。無細胞タンパク質合成系を用いて該抗体を作製する場合には、分子内のジスルフィド結合が保持される低還元状態で行う。また、該抗体を標識化物質を介して固相に結合させることにより固相化単鎖抗体を作製することもできる。

【書類名】 出願人名義変更届

【整理番号】 A5790

【提出日】 平成15年 1月21日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2002-210067

【承継人】

【識別番号】 594016182

【氏名又は名称】 遠藤 弥重太

【承継人代理人】

【識別番号】 100080791

【弁理士】

【氏名又は名称】 高島 一

【電話番号】 06-6227-1156

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006965

【納付金額】 4,200円

【提出物件の目録】

【物件名】 承継人であることを証明する書面 1

【提出物件の特記事項】 手続補足書により提出する。

【包括委任状番号】 0300238

【プルーフの要否】 要

2002-210067

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[594016182]

- | | |
|----------|------------------|
| 1. 変更年月日 | 1994年 7月20日 |
| [変更理由] | 住所変更 |
| 住 所 | 愛媛県松山市朝美1丁目5番3号 |
| 氏 名 | 遠藤 弥重太 |
| | |
| 2. 変更年月日 | 2000年 5月15日 |
| [変更理由] | 住所変更 |
| 住 所 | 愛媛県松山市久万ノ台478-17 |
| 氏 名 | 遠藤 弥重太 |

願 2002-210067

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000005968]

1. 変更年月日

1994年10月20日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

氏 名

三菱化学株式会社